

脂肪酸結合タンパク質を介したシヌクレイノパチー の発症機序と治療薬に関する研究

著者	松尾 和哉
号	56
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	薬博(薬科)第107号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00132332

脂肪酸結合タンパク質を介したシヌクレイノパチーの発症機序と治療薬に関する研究

生命薬科学専攻 薬理学分野

松尾 和哉

【背景・目的】

シヌクレイノパチー（パーキンソン病やレビー小体型認知症）はパーキンソン症状や認知症を主訴とする神経難病である。根本治療法は皆無であり、超高齢化社会を迎えた現代において患者数は増加の一途をたどる。 α -synuclein (α Syn) は中枢神経終末に豊富なタンパク質であるが、シヌクレイノパチーでは毒性のある異常 α Syn の蓄積を主要病変とする。異常 α Syn はプリオンのように細胞間を伝播してその病原性を感染させていく（プリオノイド仮説）。病巣の広がりとともに多様な症状が出現することから、シヌクレイノパチーの根本的治療には病原性 α Syn の伝播を阻害して α Syn 病理形成を抑制する必要がある。 α Syn の oligomer 形成や凝集を促進する因子に多価不飽和脂肪酸が挙げられるが、多価不飽和脂肪酸は水に不溶であり、細胞内では自身を輸送するキャリアを必要とする。これを担うのが脂肪酸結合タンパク質 (FABP) である。パーキンソン病の主要な病変部位である黒質ドパミン神経には FABP3 が高発現することから、これまで当研究室ではパーキンソン病における FABP3 の役割について明らかにしてきた。

先行研究では、ドパミン神経毒 1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) による酸化ストレス下で、FABP3 は α Syn と共凝集して細胞毒性を媒介し、 α Syn 病理形成とパーキンソン症状は FABP3 欠損により抑制された (Shioda et al., J. Biol. Chem., 2014)。これらをふまえ、FABP3 に対する脂肪酸の結合を競合阻害する化合物 MF1 を創製した (PCT/JP2017/13742)。本研究では、FABP3 リガンド MF1 の薬効評価とともに、プリオノイド仮説に基づく FABP3 の機能解明を介して、疾患修飾標的として FABP3 を提唱することを目的とした。

【結果】

1. MPTP 投与マウスに対する FABP3 リガンド MF1 の薬効評価

MPTP 投与マウスに MF1 (0.1, 0.3, 1.0 mg/kg, p.o.) を慢性投与し、 α Syn 病理や行動障害に対する薬効を評価した。MPTP 投与マウスにおけるパーキンソン症状は、既存の対症療法薬 L-DOPA の投与により改善した。MF1 は L-DOPA と同等にパーキンソン症状を改善した。MPTP 投与により、運動機能を制御する黒質ドパミン神経では α Syn の細胞内蓄積および oligomer 形成をとともう神経脱落を引き起こした。L-DOPA はこれらの α Syn 病理や

神経脱落を抑制しない一方、MF1 は α Syn 病理形成の阻害によりドパミン神経を保護した。MF1 と構造が類似し FABP3 に対する親和性が低い MF4 はこれらの神経病理と行動障害を改善しなかった。したがって、MF1 は FABP3 に対する脂肪酸の結合を阻害することで α Syn 病理形成を抑制し、FABP3 が疾患修飾標的となり得ることが示唆された。

2. α -synuclein 脳内伝播における FABP3 の機能解明

MPTP モデルではプリオン様の細胞間伝播は再現することができないため、 α Syn 細胞間伝播を再現する α Syn 脳内注入マウスを用いて、 α Syn 細胞間伝播における FABP3 の役割を明らかにすることにした。病原性をもつ α Syn pre-formed fibril (PFF) を *in vitro* で作製して脳内へ注入すると、内在性の正常 α Syn が病原性を獲得しリン酸化修飾 (Ser129) を受けた α Syn が広範囲で検出される。当該モデルの α Syn 病理および行動障害を野生型および FABP3 欠損マウスで比較するとともに、MF1 (1.0 mg/kg, p.o.) を慢性投与してその薬効を評価した。 α Syn PFF を野生型マウスの両側黒質へ注入すると、2 週間後よりパーキンソン症状が見られ、その後に記憶学習機能障害も見られた。一方、FABP3 欠損マウスに α Syn PFF を注入してもこれらの行動障害は見られなかった。次に脳内のリン酸化 α Syn 陽性細胞数を解析した。野生型マウスでは、注入部位の黒質のみならず広範囲でリン酸化 α Syn が検出された。FABP3 欠損マウスではリン酸化 α Syn 陽性細胞数が野生型マウスよりも少なかった。次に野生型マウスで MF1 の薬効を評価した。MF1 の慢性投与は、 α Syn PFF によるパーキンソン症状、記憶学習機能障害ともに抑制した。また、脳内におけるリン酸化 α Syn 陽性細胞数も MF1 により減少した。以上の結果より、FABP3 は α Syn の細胞間伝播を媒介すること、FABP3 リガンドが α Syn 病理進展を阻害し得ることが示唆された。

3 黒質ドパミン神経における内在性 α -synuclein の病原性獲得における FABP3 の関与

FABP3 が細胞内への病原性 α Syn の取り込みに関与しているのか、内在性 α Syn への病原性の感染に関与しているのかは不明である。FABP3 は細胞内で脂肪酸の輸送を担うことから、黒質ドパミン神経において内在性 α Syn への病原性の感染に関与していると仮説を立てた。これを明らかにするため、 α Syn を蛍光色素 ATTO で標識し、外来性 α Syn を可視化した。また、 α Syn は神経終末から細胞体へ逆行性に輸送されやすいこと、FABP3 は線条体ドパミン神経終末には少ないことがわかっている。そこで、マウス線条体へ ATTO 標識 α Syn を注入し、黒質ドパミン神経における蓄積と内在性 α Syn への病原性の感染について

FABP3 欠損マウスを用いて経時的に評価した。野生型マウスの黒質ドパミン神経において、 α Syn monomer は注入の 1 日後に一過性に蓄積し、その後速やかに消失した。一方 α Syn fibril は徐々に蓄積し、注入の 10, 30 日後にはリン酸化 α Syn 陽性反応が認められた。リン酸化 α Syn が検出された時点からドパミン神経が減少し始めた。また、リン酸化 α Syn は ATTO 陽性部分と陰性部分の双方があることから、内在性 α Syn が病原性を獲得していることを確認した。FABP3 欠損マウスでは、外来性 α Syn の蓄積、 α Syn のリン酸化反応、ドパミン神経の脱落が抑制された。以上の結果より、外来性 α Syn が線条体ドパミン神経終末から黒質ドパミン神経へ逆行性に輸送された後、FABP3 はその蓄積を介した病原性の感染を媒介し、細胞毒性を引き起こすことが明らかになった。したがって、FABP3 はプリオンイド仮説に基づく α Syn の病原性伝播に寄与していることが示唆された。

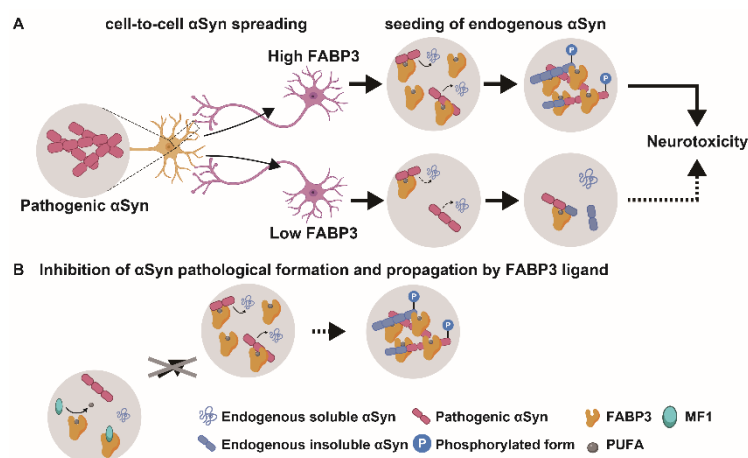
4 前脳基底部 GABA 神経における α -synuclein 毒性および記憶学習機能障害における FABP3 の役割

主に黒質ドパミン神経の α Syn 病理における FABP3 の関与とパーキンソン症状に着目してきたが、シヌクレイノパチーの認知症における FABP3 の関与は不明である。レビー小体型認知症は、パーキンソン症状の発症前または発症後 1 年以内に認知症が発症すると定義されており、海馬や大脳皮質における α Syn 病理が関与することが示唆されている。一方、これらの領域における α Syn 病理形成は黒質よりも遅く最後期とされているため、認知症の発症には、より早期に α Syn 病理が形成される領域が存在すると考えられる。海馬、大脳皮質以外に記憶学習機能に関与する領域として、前脳基底部の内側中隔野が挙げられる。内側中隔野における α Syn 病理形成は黒質とほぼ同時期であるとされており、レビー小体型認知症の定義にも一致する。一方、内側中隔野における α Syn 病理がどの程度疾患に寄与しているのかは不明である。したがって、シヌクレイノパチーの認知症に関与し得る領域として内側中隔野に着目した。前述と同様のモデルを用いた結果、 α Syn fibril 注入の 30, 60 日後に記憶学習機能が低下していた。次に注入の 30 日後の時点で内側中隔野における病理解析を行った。当該領域では、特にアセチルコリンと GABA 神経が記憶学習機能に関与しているため、両神経細胞に対する α Syn の影響を評価した。 α Syn fibril は、アセチルコリン神経に影響を与えなかった一方 GABA 神経細胞を減少させた。また、リン酸化 α Syn は GABA 神経に蓄積していた。次に、GABA 神経選択的に α Syn 病理が形成される機構を解析した。 α Syn 病理は内在性 α Syn の発現量が多いほど形成されやすいことから、黒質を比

較対象として α Syn の発現量を naïve マウスで解析した。内側中隔野における α Syn の発現量は黒質と同程度であった。また、その局在は神経終末に多く、アセチルコリン、GABA 神経細胞間で偏りもなかった。すなわち、内側中隔野の GABA 神経における α Syn 病理形成にはその他の因子による影響が考えられる。内側中隔野における FABP3 の発現は不明であったため、FABP3 に関して同様の解析を行った。黒質と比較して、内側中隔野では FABP3 の発現量が高かった。また、アセチルコリン神経にはほとんど発現しておらず、GABA 神経に高発現していた。内側中隔野 GABA 神経選択的な α Syn 病理形成の要因として FABP3 の発現が考えられるため、次に FABP3 欠損マウスに α Syn fibril を注入して抑制効果を解析した。内側中隔野 GABA 神経におけるリン酸化 α Syn の蓄積と GABA 神経細胞の減少は FABP3 欠損マウスで抑制された。FABP3 欠損マウスでは神経病理の阻害を介して記憶学習機能障害も抑制された。以上の結果より、シヌクレイノパチーにおける記憶学習機能障害には内側中隔野 GABA 神経における α Syn 病理が関与し得ること、パーキンソン症状のみならず、認知症においても FABP3 が分子レベルで中枢を担うことが示唆された。

【結論】

本研究により、MPTP 投与で再現される典型的なパーキンソン症状や黒質ドパミン神経における α Syn 病理形成のみならず、シヌクレイノパチー全般における病原性 α Syn の伝播を FABP3 が媒介すること、FABP3 への脂肪酸結合を阻害する化合物がこれらの α Syn 病理や行動障害を抑制することが想定される (下図)。本研究成果は、未だ疾患修飾薬のないシヌクレイノパチーにおいて、FABP3 をその標的として提唱することに貢献するものである。



図：(A) FABP3 を介した α Syn 病理形成機構と (B) FABP3 リガンドによる阻害

論文審査結果の要旨

論文提出者：松尾 和哉

論文審査委員（主査）：平澤 典保

論文題目：脂肪酸結合タンパク質を介したシヌクレイノパチーの発症機序と治療薬に関する研究

シヌクレイノパチー（パーキンソン病やレビー小体型認知症）はパーキンソン症状や認知症を主訴とする神経変性疾患である。シヌクレイノパチーでは毒性のある異常 α -synuclein (α Syn) の凝集体形成とその蓄積（レビー小体）を主要病変とする。異常 α Syn はプリオンのように細胞間を伝播してその病原体を感染させていく（プリオノイド仮説）。 α Syn の凝集体形成や凝集を促進する因子として多価不飽和脂肪酸が考えられる。多価不飽和脂肪酸は水に不溶であり、細胞内では脂肪酸を輸送するキャリアを必要とする。これを担うのが脂肪酸結合タンパク質（FABP）である。当研究室では神経細胞に発現する FABP3 のパーキンソン病発症との関係を明らかにした。本研究では、FABP3 リガンド MF1 の薬効評価とともに、プリオノイド仮説に基づく α Syn の凝集体形成・伝播における FABP3 の機能を解析して、次の結果を得た。1) ミトコンドリア毒である MPTP 誘発のパーキンソン病モデルマウスにおいて、MF1 経口投与は α Syn の凝集体形成を阻害して、ドパミン神経細胞死を抑制した。2) 黒質への線維型 α Syn 注入マウスで MF1 投与は α Syn の大脳皮質への伝播を抑制して、運動機能・認知機能の障害を改善した。3) 線条体への線維型 α Syn 注入マウスでは黒質ドパミン神経が逆行性に変性脱落した。4) 線条体への線維型 α Syn 注入マウスでは前脳基底部の GABA 神経が早期に変性脱落し、認知機能障害の原因となった。以上、本研究ではパーキンソン病モデルマウス、線維型 α Syn 注入マウスを用いて、プリオノイド仮説に基づく α Syn の凝集体形成、伝播、毒性発現の機序について重要な知見を得た。さらに、 α Syn の凝集体形成・伝播を抑制する FABP3 リガンド MF1 の薬効を証明して、シヌクレイノパチー治療候補薬としての可能性を示した。パーキンソン病やレビー小体型認知症では運動機能障害や REM 睡眠行動障害から認知機能障害に移行することが報告されている。本研究では FABP3 リガンド MF1 が神経細胞間の伝播を抑制することから、脳幹から大脳皮質への異常 α Syn の伝播を阻止することが期待できる。治療薬 MF1 が認知症への進行を止めることを示した重要な基礎研究である。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として合格と認める。